



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/53, 9/02, C12P 21/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/02697</p> <p>(43) 国際公開日 1999年1月21日 (21.01.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/02936</p> <p>(22) 国際出願日 1998年6月30日 (30.06.98)</p> <p>(30) 優先権データ 60/051,917 1997年7月8日 (08.07.97) US</p> <p>(71) 出願人 キッコーマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION)[JP/JP] 〒278-8601 千葉県野田市野田339番地 Chiba, (JP)</p> <p>(72) 発明者 廣川浩三(HIROKAWA, Kozo) 梶山直樹(KAJIYAMA, Naoki) 村上成治(MURAKAMI, Seiji) 〒278-8601 千葉県野田市野田339番地 キッコーマン株式会社内 Chiba, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.) 〒105-0001 東京都港区虎ノ門1丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3階 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 JP, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示</p>	
<p>(54) Title: MUTANT BIOLUMINESCENT PROTEIN AND PROCESS FOR PRODUCING THE MUTANT BIOLUMINESCENT PROTEIN</p> <p>(54) 発明の名称 変異型生物発光タンパク質、および変異型生物発光タンパク質の製造法</p> <p>(57) Abstract A bioluminescent protein improved in catalytic efficiency or stability, specifically a luciferase having excellent stabilities such as heat resistance and a high catalytic efficiency.</p>		

(57)要約

本発明は、触媒効率もしくは安定性の向上した生物発光タンパク質に関する。
本発明によれば、耐熱性等の安定性に優れ、しかも触媒効率の高いルシフェラーゼを提供することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	CW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CC	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボアール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明 細 書

変異型生物発光タンパク質、および変異型生物発光タンパク質の製造法

技術分野

本発明は、変異型生物発光タンパク質及び変異型生物発光タンパク質の製造法に関する。

背景技術

従来、野生型ホタルルシフェラーゼとしては、例えば、ゲンジボタル(*Luciola cruciata*)、ヘイケボタル(*Luciola lateralis*)、北アメリカのホタル(*Photinus pyralis*)、東ヨーロッパのホタル(*Luciola mingrelica*)、ツチボタル(*Lampyrus noctiluca*)等が知られている。

また、これらの野生型ホタルルシフェラーゼを元として変異型ルシフェラーゼ(耐熱性変異、発光色変異等)も取得されている。

本酵素に変異をいれることにより、触媒能力や安定性を向上させることは極めて重要である。すなわち、触媒能力の向上により酵素の使用量の低減につながり、一方安定性の向上により野生型では困難であった反応条件下での使用が可能となるからである。

しかしながら、これまでに耐熱性等の安定性に優れ、しかも触媒能力の高いルシフェラーゼについては、報告されていない。

発明の開示

従って、本発明の課題は、安定性に優れ、しかも触媒能力の高い変異型ルシフェラーゼを提供することにある。

本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、1個以上のアミノ酸の置換、改変、除去、添加、及び複数のルシフェラーゼの融合等により、触媒能力及び／または熱安定性の向上した変異型ルシフェラーゼが得られる等の知見を得、本発明を完成した。

すなわち、本発明は次の構成を含むものである。

- (1) 触媒能力もしくは安定性の向上した生物発光タンパク質。
- (2) 触媒能力の向上としては、基質親和性、最大反応速度、安定性の向上としては耐熱性、pH安定性、低イオン濃度下での安定性の5種のうち、いずれか1種以上を含むことを特徴とする(1)に記載の生物発光タンパク質。
- (3) 生物発光タンパク質が、甲虫類 (Coleoptera) 由来ルシフェラーゼであることを特徴とする(1) または(2) に記載の生物発光タンパク質。
- (4) 生物発光タンパク質が、ホタル由来ルシフェラーゼであることを特徴とする(1) または(2) に記載の生物発光タンパク質。
- (5) 生物発光タンパク質の前駆体の修飾により産生することを特徴とする、(1) または(2) に記載の生物発光タンパク質の製造法。
- (6) 前記修飾として、1個以上のアミノ酸の置換、改変、除去、添加、及び複数のタンパク質の融合を特徴とする、(1) または(2) に記載の生物発光タンパク質の製造法。
- (7) ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつ複数種のホタルルシフェラーゼを融合してなる(1) または(2) に記載の生物発光タンパク質。
- (8) ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつゲンジボタル及びアメリカボタルルシフェラーゼを融合してなる(1) または(2) に記載の生物発光タンパク質。
- (9) ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつヘイケボタル及びアメリカボタルルシフェラーゼを融合してなる(1) または(2) に記載の生物発光タンパク質。
- (10) ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつゲンジボタル及びヘイケボタルルシフェラーゼを融合してなる(1) または(2) に記載の生物発光タンパク質。
- (11) ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつゲンジボタルルシフェラーゼの219番目に対応するアミノ酸残基が変異されていることを特徴とする(1) または(2) に記載の生物発光タンパク質。
- (12) ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつゲンジボタルルシフェラーゼの239番目に対応するアミノ酸残基が変異されていることを特徴とする(1) または(2) に記載の生物発光タンパク質。
- (13) ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつゲンジボタルルシフェラーゼの29

0 番目に対応するアミノ酸残基が変異されていることを特徴とする(1) または(2) に記載の生物発光タンパク質。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明において、「pH安定性の向上したルシフェラーゼ」とは、次のいずれかの性質を有するものをいう。(i) 従来公知のルシフェラーゼと比較したときに、80%以上の残存活性を示すpH範囲が広がっているもの。(ii) 特定のpHの緩衝液中における残存活性を、従来公知のルシフェラーゼと比較したとき、残存活性が、従来公知のルシフェラーゼより上昇しているもの。(iii) 100mM 酢酸バッファー(pH5.5)中、25℃、22時間処理した後の残存活性が、75%以上のもの。(iv) 100mM CHESバッファー(pH9.0)中、25℃、22時間処理した後の残存活性が、10%以上のもの。

本発明における遺伝子の改変による触媒能力もしくは安定性の向上したルシフェラーゼが提供される前提として、野生型ルシフェラーゼ遺伝子及びその組み換え体DNAを調製することが必要である。

野生型ルシフェラーゼ遺伝子は、甲虫類(Coleoptera)由来のものであれば、如何なるものでも用いることが可能であり、例えば、ゲンジボタル(*Luciola cruciata*)、ヘイケボタル(*Luciola lateralis*)、北アメリカのホタル(*Photinus pyralis*)、東ヨーロッパのホタル(*Luciola mingrelica*)、ツチボタル(*Lampyris noctiluca*)等由来のものが挙げられる。

上記野生型ゲンジボタル由来ルシフェラーゼ遺伝子及びその組み換え体DNAは、特開平1-34289号及び特開平1-51086号公報記載の方法、また、野生型ヘイケボタル由来ルシフェラーゼ遺伝子及びその組み換え体DNAは、特開平2-13379号及び特開平2-65780号公報記載の方法等により得ることができる。

そして、得られた野生型Coleopteraルシフェラーゼ遺伝子を修飾して、変異型ルシフェラーゼ遺伝子を得るのである。この修飾においてはColeopteraルシフェラーゼ遺伝子をそのまま修飾してもよく、また該遺伝子をプラスミドベクターあるいはバクテリオファージベクター等のベクターDNAに組み込んで得られる組み

換え体DNAを修飾してもよい。これら修飾されたルシフェラーゼ遺伝子によりColeopteralルシフェラーゼの1個以上のアミノ酸の置換、改変、除去、添加及び複数のColeopteralルシフェラーゼの融合等といった変異ルシフェラーゼが作成されるのである。

まず、上記Coleopteralルシフェラーゼにおいて、1個以上のアミノ酸の置換、改変、除去、添加を行なうには、Coleopteralルシフェラーゼ遺伝子又は当該遺伝子の組み込まれた組み換え体DNAと変異原となる薬剤とを接触作用させる方法、紫外線照射法、遺伝子工学的手法又は蛋白質工学的手法を駆使する方法等を広く用いることができる。

上記変異処理に用いられる変異原となる薬剤としては、例えば、ヒドロキシルアミン、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)、亜硝酸、亜硫酸、ヒドラジン、蟻酸、5-ブロモウラシル等を挙げることができる。この接触作用の諸条件は、用いる薬剤の種類等に応じた条件を採ることが可能であり、現実にも所望の変異を野生型ルシフェラーゼ遺伝子において惹起することができる限り特に限定されない。通常、好ましくは0.5~12Mの上記薬剤濃度において、20~80℃の反応温度下で10分間以上、好ましくは10~180分間接触作用させることで、所望の変異を惹起可能である。紫外線照射を行なう場合においても、上記の通り常法に従うことができる(現代化学、pp24~30、1989年6月号)。

蛋白質工学的手法を駆使する方法としては、一般的に、部位特異的変異(Site Specific Mutagenesis)として知られる手法を用いることができる。例えば、Kramer法[Kramer, W. et al., Nucl. Acids Res., vol. 12, pp9441-9456 (1984) : Kramer, W. et al., Methods in Enzymol., vol. 154, pp350-367 (1987) : Bauer, C.E. et al., Gene, vol. 37, pp73-81 (1985), vol. 37, pp73-81 (1985)]、Eckstein法[Taylor, J. W. et al., Nucleic Acids Res. vol. 13, pp8749-8764 (1985) : Taylor, J. W. et al., Nucleic Acids Res. vol. 13, pp8765-8785 (1985) : Nakamaye, K., et al., Nucleic Acids Res. vol. 14, pp9679-9698 (1986)]、Kunkel法[Kunkel, T. A., Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 82, pp488-492 (1985) : Kunkel, T. A., et al., Methods Enzymol., vol. 154, pp367-382 (1987)]等が挙げられる。

一方、複数のColeopteraルシフェラーゼの融合としては、一本以上のルシフェラーゼ遺伝子において部位特異的変異により目的の制限酵素部位を導入し、その後適切な制限酵素で切断開裂した後、複数のルシフェラーゼ遺伝子断片をつなぎあわせる方法、及び特異的プライマー類を使用したポリメラーゼチェーン反応により、一本以上のルシフェラーゼ遺伝子断片を作製しつなぎあわせる方法、さらにはDNA シャッフリング法 [Willem P.C. Stemmer, vol. 370, pp389-391(1994)] 等が挙げられる。

また、上記遺伝子改変法の他に、有機合成法又は酵素合成法により、直接所望の改変ルシフェラーゼ遺伝子を合成し得ることも可能である。上記方法により得られる所望のルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列の決定・確認は、例えば、マキシム-ギルバートの化学修飾法 [Maxam and Gilbert, Methods in Enzymol., vol. 65, pp499 - 560 (1980)] やM13ファージを用いるジデオキシヌクレオチド鎖終結法 [Messing, et al. Gene, vol. 19, pp269-276 (1982)] 等により行なうことができる。上記の変異方法、すなわち1個以上のアミノ酸の置換、改変、除去、添加及び複数のColeopteraルシフェラーゼの融合を組み合わせることによっても、所望のルシフェラーゼを得ることが可能であることは言うまでもない。

以上の変異手法により、複数のColeopteraルシフェラーゼが融合した、いわゆるキメラルシフェラーゼをコードする変異型ルシフェラーゼ遺伝子並びにゲンジボタル及びヘイケボタルルシフェラーゼの219、239及び290番目に対応するアミノ酸残基が変異されていることを特徴とするポリペプチドをコードする変異型ルシフェラーゼ遺伝子を得ることができる。219、239及び290位のアミノ酸の変異としては、例えば、第4表で表されるものが挙げられる。

なお、ゲンジボタル及びヘイケボタルルシフェラーゼの219、239、及び290番目のアミノ酸は、アメリカボタルルシフェラーゼの217番目のバリン、237番目のイソロイシン、288番目のバリンに対応する。

上述の如くして得られた変異型ルシフェラーゼ遺伝子を、常法により、バクテリオファージ、コスミド、又は原核細胞若しくは真核細胞の形質転換に用いられるプラスミド等のベクターに組み込み、各々のベクターに対応する宿主を常法により、形質転換・形質導入することができる。ここで用いられる宿主としては、

エッシャーリシア属に属する微生物、例えば大腸菌 (*E. coli*) JM101 (ATCC33876)、大腸菌 (*E. coli*) DH1 (ATCC33849)、大腸菌 (*E. coli*) HB101 (ATCC33694)、大腸菌 (*E. coli*) XL1-blue (フナコシより購入) 等が挙げられ、これらの微生物を選択する場合には、ハナハン (Hanahan) の方法 [ディーエヌエー・クローニング (DNA Cloning)、第1巻、第109~135頁 (1985)] 等により形質転換するか、又は [モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、第256~268頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) (1982)] 記載の方法等により形質導入することにより形質転換体又は形質導入体を得ることが可能である。

そして、上記菌株より変異型ルシフェラーゼ生産能を有する菌株をスクリーニングすることにより、目的とする形質転換体又は形質導入体、すなわち、変異型ルシフェラーゼ遺伝子をベクターDNAに挿入した組み換え体DNAを含み、変異型ルシフェラーゼ生産能を有する菌株を得ることができる。こうして得られた菌株より純化された新規な組み換え体DNAを得るには、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (WILEY Interscience, 1989) unit 1. 7 等により得ることができる。そして、このようにして得られた組み換え体DNAより変異型ルシフェラーゼ遺伝子を含有するDNAを得るには、例えば、該プラスミドDNAに制限酵素、例えばEcoRIを温度30~40°C、好ましくは37°C程度で1~24時間、好ましくは2時間程度作用させて、反応終了液をアガロースゲル電気泳動法 [モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning)、第150頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) (1982) 記載] で処理することにより得ることができる。

次に、本発明の変異型ルシフェラーゼの製造方法について説明する。本発明の変異型ルシフェラーゼは、上記のようにして得られた形質転換体又は形質導入体を培養し、得られる培養物からルシフェラーゼを精製することにより得られる。培養方法は、通常の固体培養法で培養してもよいが、液体培養法を採用して培養するのが好ましい。

上記菌株を培養する培地としては、例えば、酵母エキス、トリプトン、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー又は大豆若しくは小麦ふすまの浸出液等

の1種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸第1カリウム、リン酸第2カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第2鉄、硫酸第2鉄又は硫酸マンガン等の無機塩類の1種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが挙げられる。

なお、培地の初発pHは、pH7～9に調整するのが適当である。また培養時間は30～42℃、好ましくは37℃前後で4～24時間、好ましくは6～20時間であり、通気攪拌深部培養、振盪培養、静置培養等により実施するのが好ましい。培養終了後、該培養物より変異型ルシフェラーゼを採取するには、通常の酵素精製手段を用いて得ることができる。例えば、常法により菌体を超音波破壊処理、磨砕処理等するか、または、リゾチーム等の溶菌酵素を用いて本酵素を抽出するか、またはトルエン等の存在下で振盪もしくは放置して自己消化を行なわせ本酵素を菌体外に排出させることができる。

そして、この溶液を濾過、遠心分離等して固形部分を除去し、必要によりストレプトマイシン硫酸、プロタミン硫酸塩、硫酸マンガン等を添加して核酸を除去する。次いで、これに硫安、アルコール、アセトン等を添加して分画し、沈殿物を採取し、粗酵素液を得る。該粗酵素液を各種クロマトグラフィー、電気泳動等にかけて精製酵素標品を得る。例えば、セファデックス、ウルトロゲルもしくはバイオゲル等を用いるゲル濾過法、イオン交換体を用いる吸着溶出法、ポリアクリルアミドゲル等を用いる電気泳動法、ヒドロキシアパタイトを用いる吸着溶出法、蔗糖密度勾配遠心法等の沈降法、アフィニティクロマト法、分子ふるい膜若しくは中空糸膜等を用いる分画法等を適宜選択し、又は、これらを組合わせて実施することにより、精製された酵素標品を得ることが出来る。

なお、精製された変異型ルシフェラーゼが目的とする変異を有するアミノ酸配列を有するか否かの確認は、公知のアミノ酸分析、例えばエドマン分解法による自動アミノ酸配列決定法等により行なうことができる。

図面の簡単な説明

第1図は、精製標品(HLKIルシフェラーゼ)及びヘイケ野生型ルシフェラーゼについて、種々のバッファー中で処理したのちの残存活性を示した図である。

発明を実施するための最良の方法

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明する。

〔実施例 1〕

アメリカボタル(*Photinus pyralis*)由来のルシフェラーゼ発現用プラスミド pT3/T7-LUC (CLONTECH社より入手) 10 μ g を、50 μ l 制限酵素緩衝液 K[20mM トリス-塩酸 (pH8.5), 10mM $MgCl_2$, 100mM KCl, 1mM ジチオスレイトール] に添加したものに、更に、制限酵素 SphI 及び SmaI (宝酒造・社より入手) を夫々 20 単位添加し、37°C で 2 時間切断反応を行なった。この反応液を、0.8% の低融点アガロースゲル電気泳動に供し、アメリカボタル由来のルシフェラーゼ遺伝子の C 末端部分を含む約 1.1kb の DNA 断片を含むゲルを切り出し、65°C で 5 分間加熱することによりゲルを融解した。融解したゲルに 2 倍容の TE 緩衝液 [10mM トリス-塩酸 (pH8.0), 0.5mM EDTA] を加え、TE 緩衝液で飽和したフェノールを等量添加し、攪拌した。12,000r.p.m. で 15 分間の遠心分離後、水層を分取し 2 倍容の冷エタノールを加え、エタノール沈殿を行ない、アメリカボタル由来のルシフェラーゼ遺伝子の C 末端部分を含む DNA 断片を回収した。

一方、ゲンジボタル (*Luciola cruciata*) 由来のルシフェラーゼ発現用プラスミド pGLf37 (特開平5-244942号記載) に合成 DNA (配列番号 1 : CTC TAG CAT GCG AAA ATC TAG、配列番号 2 : CTG CAG GCC TGC AAG CTT GG) [ベックマン社製 システム1 プラス DNA 合成機により作製] を加え ポリメラーゼチェーン反応 (PCR) を行なった。50 μ l の PCR 反応液は、20 μ g のプラスミド pGLf37, 夫々 50pmol の合成 DNA、1 20mM トリス-塩酸 (pH8.0)、6mM $(NH_4)_2SO_4$, 10mM KCl, 2.5mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 夫々 0.2mM dATP, dGTP, dCTP 及び dTTP 並びに 2.5 単位の KOD DNA polymerase (東洋紡・社より入手) を含有させたものであった。この混液をパーキンエルマー (Perkin-Elmer) サーマルサイクラー PJ2000 中で、25 サイクル: 98°C 15 秒, 65°C 2 秒, 74°C 30 秒 の条件でインキュベートした。反応混液に、TE 緩衝液で飽和したフェノールを等量添加し、攪拌した。12,000r.p.m. で 15 分間の遠心分離後、水層を分取し 2 倍容の冷エタノールを加え、エタノール沈殿を行ない、DNA 断片を回収した。これを再び TE 緩衝液に溶解し、SphI で切断した後、低融点ア

ガロースゲルに供し、ゲンジボタル由来のルシフェラーゼ遺伝子のN末端部分を含む約3.4kbpのDNA断片を回収した。

このようにして得られたpT3/T7-LUCのSphI-SmaI断片50ng及びpGLf37のSphI切断断片50ngを20 μ lのDNAリガーゼ緩衝液中で、300単位のT4 DNAリガーゼを添加して、15°Cで16時間インキュベートした。反応混液を用いて大腸菌JM109(東洋紡・社より入手)をハナハン(Hana-han)の方法[DNA Cloning, 第1巻、第109-135頁(1985)]により形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを選択した。

出現したコロニーから、アルカリSDS法によりプラスミドを取り出した。このプラスミドを用いてダイプライマータックシーケンシングキット(アプライドバイオシステムズ社製)により反応を行ない、ABI 373A DNAシーケンサー(アプライドバイオシステムズ社製)で泳動解析を行なうことにより塩基配列の決定を行なった。決定した塩基配列を配列番号6に、また、該塩基配列から翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号5に夫々示した。このようにして得られたプラスミドをpGA1と命名した。

プラスミドpGA1を用いて大腸菌JM109株を上記方法により形質転換し、大腸菌JM109(pGA1)を得た。大腸菌JM109(pGA1)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5990として寄託されている。

大腸菌JM109(pGA1)をLB-amp寒天培地[バクトトリプトン1%(W/V)、酵母エキス0.5%(W/V)、NaCl 0.5%(W/V)、50 μ g/mlアンピシリン及び寒天1.4%(W/V)]に接種し、37°Cで培養した。16時間後、出現したコロニー菌体をLB-amp培地[バクトトリプトン1%(W/V)、酵母エキス0.5%(W/V)、NaCl 0.5%(W/V)及び50 μ g/mlアンピシリン]10mlに接種し、37°Cで18時間振盪培養を行なった。この培養液10mlを2Lの上記LB-amp培地に接種し、30°Cで6時間振盪培養した後、8,000r.p.m.で10分間の遠心分離操作により湿潤菌体を40g得た。回収した菌体を、0.1M KH₂PO₄(pH7.8)、2mM EDTA、1mM ジチオスレイトール及び0.2mg/mlプロタミン硫酸からなる緩衝液20mlに懸濁したものに、更に10mg/mlのリゾチーム溶液2mlを添加し、水中に15分放置した。

次いで、この懸濁液を、エタノール/ドライアイス浴中で凍結し、次に、温度25°Cに放置し、完全に解凍した。更に、12,000 r.p.m.で5分間遠心分離操作を

行なうことにより、上清として粗酵素20mlを得た。このようにして得た粗酵素液を特開平1-141592号記載の方法により精製し、純化した酵素をGA1ルシフェラーゼと命名した。この精製標品について基質のATPに対する親和性を測定した。50mM HEPES(pH7.5)、0.2mM ルシフェリン及び10mM MgSO₄を含む溶液中でATP濃度を0から2mMまで変化させた際の発光量のピークをルミノメーターML3000（ダイナテック社製）により測定した結果を第1表に示した。これより求めたGA1ルシフェラーゼのATPに対する親和性は、野生型アメリカボタルルシフェラーゼの約5.73倍、野生型ゲンジボタルルシフェラーゼの約11.4倍であった。このGA1ルシフェラーゼは野生型のものと比較して、著しくATPに対する親和性が向上しているため、有用性の高い酵素であることが判明した。

第1表

	Km (mM)
アメリカボタルルシフェラーゼ	0.152
ゲンジボタルルシフェラーゼ	0.301
GA1ルシフェラーゼ	0.0265

〔実施例2〕

アメリカボタル(*Photinus pyralis*)由来のルシフェラーゼ発現用プラスミドpT3/T7-LUC (CLONTECH社より購入)10 μ gを、50 μ l緩衝液H[50mM トリス-塩酸 (pH7.5), 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM ジチオスレイトール]に添加したものに、更に、制限酵素EcoRV及びSalI(宝酒造より購入)を夫々各20単位添加し、37°Cで2時間切断反応を行なった。この反応液を、0.8%の低融点アガロースゲル電気泳動に供し、アメリカボタル由来のルシフェラーゼ遺伝子のC末端部分を含む約0.5kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、65°Cで5分間加熱することによりゲルを融解した。融解したゲルに2倍容のTE緩衝液[10mM トリス-塩酸 (pH8.0), 0.5mM EDTA]を加

え、TE緩衝液で飽和したフェノールを等量添加し、攪拌した。遠心分離(12,000r.p.m., 15分)後、水層を分取し2倍容の冷エタノールを加え、エタノール沈殿を行ない、アメリカボタルルシフェラーゼのC末端をコードする領域を含むDNA断片を回収した。

一方、耐熱性ゲンジボタルルシフェラーゼ発現用プラスミドpGLf37 T-M-2(特開平5-244942号記載)に合成DNA(配列番号3: ATC CTT TGT ATT TGA TTA AAG、配列番号4: TCT AGA GTC GAC CTG CAG GC)[ベックマン社製システム1プラスDNA合成機により作製]を加えポリメラーゼチェーン反応(PCR)を行なった。50 μ lのPCR反応液は、20 μ gのプラスミドpGLf37 T-M-2、夫々50pmolの合成DNA、120mM トリス-塩酸(pH8.0)、6mM (NH₄)₂SO₄、10mM KCl、2.5mM MgSO₄、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、夫々0.2mM dATP、dGTP、dCTP、dTTP及び2.5単位のKOD DNA polymerase(東洋紡社より購入)を含有させたものであった。この混液をパーキンエルマー(Perkin-Elmer)サーマルサイクラーPJ2000中で、25サイクル:98°C15秒、65°C2秒、74°C30秒の条件でインキュベートをした。反応混液に、TE緩衝液で飽和したフェノールを等量添加し、攪拌した。遠心分離(12,000r.p.m., 15分)後、水層を分取し2倍容の冷エタノールを加え、エタノール沈殿を行ない、DNA断片を回収した。これを再びTE緩衝液に溶解し、SalIで切断した後、低融点アガロースゲルに供し、ゲンジボタルルシフェラーゼのN末端をコードする領域を含むDNA断片を回収した。この領域にはpGLf37 T-M-2由来の耐熱性変異である(Thr217Ile)が含まれていた。

こうして得られた約0.5kbpのpT3/T7-LUC由来EcoRV-SalI断片50ng及び約4kbpのpGLf37 T-M-2由来SalI切断断片50ngをDNAリガーゼ緩衝液中で、300単位のT4 DNAリガーゼを添加して、15°Cで16時間インキュベートした。反応混液を用いて大腸菌JM109(東洋紡・社より入手)をハナハン(Hana-han)の方法[DNA Cloning, 第1巻、第109-135頁(1985)]により形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを選択した。

出現したコロニーから、アルカリSDS法によりプラスミドを取り出した。このプラスミドを用いてダイプライマータックシーケンシングキット(アプライドバイオシステムズ社製)により反応を行ない、ABI 373A DNAシーケンサー(

アプライドバイオシステムズ社製)で泳動解析を行なうことにより塩基配列の決定を行なった。決定した塩基配列を配列番号8に、また、該塩基配列から翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号7に夫々示した。こうして得られたプラスミドをpGGA1と命名した。

プラスミドpGGA1を用いて大腸菌JM109株を上記方法により形質転換し、大腸菌JM109(pGGA1)を得た。大腸菌JM109(pGGA1)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-5989として寄託されている。

大腸菌JM109(pGGA1)を、LB-amp寒天培地[バクトトリプトン1% (W/V)、酵母エキス0.5% (W/V)、NaCl 0.5% (W/V)、50 μ g /ml アンピシリン及び寒天1.4% (W/V)]に接種し、37°Cで培養した。16時間後、出現したコロニーをLB-amp培地[バクトトリプトン1% (W/V)、酵母エキス0.5% (W/V)、NaCl 0.5% (W/V)及び50 μ g /ml アンピシリン]10ml中、37°Cで18時間振盪培養を行なった。この培養液10mlを2Lの上記LB-amp培地に接種し、30°Cで6時間振盪培養した後、8,000r. p. m. で10分間の遠心分離操作により湿潤菌体を30g得た。回収した菌体を、0.1M KH_2PO_4 (pH 7.8)、2mM EDTA、1mMジチオスレイトール及び0.2mg/mlプロタミン硫酸からなる緩衝液20mlに懸濁し、更にこれに10mg/mlのリゾチーム溶液2mlを添加し、氷中に15分放置した。次に、この懸濁液を、エタノール/ドライアイス浴中で凍結し、次いで温度25°Cに放置し、完全に解凍した。更に、12,000r. p. m. で5分間遠心分離操作を行なうことにより、上清として粗酵素20mlを得た。こうして得た粗酵素液を特開平1-141592号記載の方法で精製し、純化した酵素をGGA1ルシフェラーゼと命名した。

この精製標品について基質のATPに対する K_m 値を測定した(第2表)。これより、GGA1ルシフェラーゼのATPに対する親和性は、野生型アメリカボタルルシフェラーゼの1.46倍、野生型ゲンジボタルルシフェラーゼの2.89倍であった。このGGA1ルシフェラーゼは、野生型ルシフェラーゼと比較して、著しくATPに対する親和性が向上しているため、有用性の高い酵素であることが判明した。

第 2 表

	Km (mM)
アメリカボタルルシフェラーゼ	0.152
ゲンジボタルルシフェラーゼ	0.301
GGA1ルシフェラーゼ	0.104

また、この酵素標品について耐熱性を測定した。10%飽和硫安を含む0.05M リン酸カリウム緩衝液(pH7.8)中で50℃の処理の後の残存活性を測定した。その結果、本酵素は50℃、20分の処理後でも80%以上の活性を維持しており、野性型アメリカボタルルシフェラーゼ及び耐熱性ゲンジボタルルシフェラーゼに比べ耐熱性が向上していることが判明した。

〔実施例 3〕

アメリカボタル(*Photinus pyralis*)由来のルシフェラーゼ発現用プラスミド pT3/T7-LUC (CLONTECH社より購入)10 μ gを50 μ l制限酵素緩衝液H [50mM トリス-塩酸 (pH7.5), 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM ジチオスレイトール]中で、制限酵素EcoRV(宝酒造より購入)を20単位添加し、37℃で2時間切断反応を行なった。この反応液を、0.8%の低融点アガロースゲル電気泳動に供し、アメリカボタルルシフェラーゼのC末端をコードする領域を含む約500bpのDNA断片を有するゲルを切り出し、65℃で5分間加熱することによりゲルを融解した。融解したゲルに2倍容のTE緩衝液[10mMトリス-塩酸 (pH8.0), 0.5mM EDTA]を加え、TE緩衝液で飽和したフェノールを等量添加し、攪拌した。遠心分離(12,000 回転、15分間)後、水層を分取し2倍容の冷エタノールを加え、エタノール沈殿を行ない、アメリカボタルルシフェラーゼのC末端をコードする領域を含むDNA断片を回収した。

一方、ヘイケボタル(*Luciola lateralis*)由来の耐熱性ルシフェラーゼ発現用プラスミド pHLf7-217Leu (特開平5-244942号公報記載) 10 μ gを50 μ lの制限酵素

緩衝液T[33mM トリス-酢酸 (pH7.9), 10mM 酢酸マグネシウム, 66mM 酢酸カリウム, 0.5mM ジチオスレイトール]中で、制限酵素EcoRV及びNaeI(宝酒造より購入)を夫々20単位添加し、37℃で2時間切断反応を行なった。この反応液を、0.8%の低融点アガロースゲル電気泳動に供し、ヘイケボタルルシフェラーゼのN末端をコードする領域を含む約4.3kbpのDNA断片を有するゲルを切り出し、65℃で5分間加熱することによりゲルを融解した。融解したゲルに2倍容のTE緩衝液[10mM トリス-塩酸(pH8.0), 0.5mM EDTA]を加え、TE緩衝液で飽和したフェノールを等量添加し、攪拌した。遠心分離(12,000 回転、15分間)後、水層を分取し2倍容の冷エタノールを加え、エタノール沈殿を行ない、ヘイケボタルルシフェラーゼのN末端をコードする領域を含むDNA断片を回収した。

こうして得られたpT3/T7-LUCのEcoRV-EcoRV断片50ng及びpHLf7-217Leu のEcoRV-NaeI断片50ngを20 μ lのDNAリガーゼ緩衝液中で、300単位のT4DNAリガーゼを添加して、15℃で16時間インキュベートした。反応混液を用いて大腸菌JM109をハナハン(Hana-han)の方法[DNA Cloning, 第1巻, 第109-135頁(1985)]により形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを選択した。選択したコロニーから実施例1に記載の方法により粗酵素を調製し、発光活性を持つものについて、アルカリSDS法によりプラスミドを取り出し、プラスミド構造を確認した。このプラスミドを用いて、ダイプライマータックシーケンシングキット(アプライドバイオシステムズ社製)により反応を行ない、ABI 373A DNAシーケンサー(アプライドバイオシステムズ社製)で泳動解析を行なうことで塩基配列を確認した(配列番号9)。また、この塩基配列より翻訳されると予想されるアミノ酸配列を配列番号10に示した。このようにして得られたプラスミドをpHHA1と命名した。

プラスミドpHHA1を用いて大腸菌JM109株を上記方法により形質転換し、形質転換体、大腸菌JM109(pHHA1)を得た。なお大腸菌JM109(pHHA1)は、工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6203として寄託されている。

さらに、実施例1に記載の方法により粗酵素液を調製し、特開平1-141592号公報の方法で酵素を純化した。この精製酵素をHHA1ルシフェラーゼと称することとした。HHA1ルシフェラーゼについて基質のATPに対する親和性を測定した。50mM トリシン(Tricine)バッファー (pH7.8)、0.2mM ルシフェリン、10mM MgSO₄を含

む溶液中でATP濃度を0から2.0mMまで変化させたときの発光量のピークをダイナテック社製ルミノメーターML3000により測定した。これよりHHA1ルシフェラーゼのATPに対する親和性(Km値)を求めた(第3表)。このHHA1ルシフェラーゼは、アメリカボタルルシフェラーゼ及びヘイケボタルルシフェラーゼと比較し、ATPに対する親和性が向上しているため、有用性の高い酵素であることが判った。

第3表

	Km (mM)
アメリカボタルルシフェラーゼ	0.161
ヘイケボタルルシフェラーゼ	0.197
HHA1ルシフェラーゼ	0.123

〔実施例4〕

ルシフェラーゼ遺伝子に任意の変異を導入するため、Kironde等の方法 [Biochem. J., 259, 421-426頁(1989)] に従って、0.8Mヒドロキシルアミン、1mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウムバッファー(pH6.0)中において、実施例2記載のプラスミドpGGA1を65℃で2時間処理した。変異処理を施したプラスミドを、G60 DNAグレードNickカラム(Pharmacia社製)で脱塩し、次いで、このプラスミドで大腸菌JM109を形質転換した。

得られた形質転換体をLB-ampプレート[バクトトリプトン1.0%(W/V)、酵母エキス0.5%(W/V)、NaCl 0.5%(W/V)、寒天1.5%(W/V)及び50 µg/mlアンピシリン]上で、37℃、12時間生育させた。出現したコロニーをニトロセルロースフィルターに移し、次いで該フィルターを0.5mMルシフェリンを含む0.1Mクエン酸ナトリウムバッファー(pH5.0)[Wood&DeLuca, Anal. Biochem., 161, 501-507頁(1987)]に浸した。該コロニーによる発光をモニターし、発光量の上昇した株を3株得ることができ、夫々を、大腸菌JM109 (pGGA2-1)、大腸菌JM109 (pGGA1-4) 及び大腸

菌JM109 (pGGA2-4) と命名した。得られた大腸菌JM109(pGGA2-1)、大腸菌JM109(pGGA1-4)及び大腸菌JM109(pGGA2-4)は、工業技術院生命工学工業技術研究所に夫々FERM BP-6206、FERM BP-6205及びFERM BP-6204 として寄託されている。これらの株よりアルカリSDS法を用いてプラスミドを抽出した。これらのプラスミドを用いて、ダイプライマータックシーケンシングキット（アプライドバイオシステムズ社製）により反応を行ない、ABI 373A DNAシーケンサー（アプライドバイオシステムズ社製）で泳動解析を行なうことで変異点を決定した（第4表）。

第4表

位置及び塩基の変化		位置及びアミノ酸の変化	
大腸菌JM109(pGGA2-1)	656位 C→T	219位 Thr→Ile	
大腸菌JM109(pGGA1-4)	868位 G→A	290位 Val→Ile	
大腸菌JM109(pGGA2-4)	715位 G→A	239位 Val→Ile	

さらに、大腸菌JM109(pGGA2-1)、大腸菌JM109(pGGA1-4)及び大腸菌JM109(pGGA2-4)から、実施例1に記載の方法により粗酵素液を抽出し、特開平1-141592号公報記載の方法でこれらの変異型酵素を純化した。純化した酵素を夫々、GGA1 T219Iルシフェラーゼ、GGA1 V290Iルシフェラーゼ及びGGA1 V239Iルシフェラーゼと命名した。これらの酵素について、基質ATPに対する触媒効率(V_{max}/K_m)を測定した。発光反応は、50mMトリシンバッファー(pH7.8)、2.0mMルシフェリン、10mM $MgSO_4$ 中のATPを0mMから 1.0×10^{-3} mMまで変化させた基質混合液を、酵素と混合することにより行なった。このとき、ルミノメーターML3000（ダイナテック社製）を用いて、反応開始後5秒から15秒までの発光量の積算を測定し、触媒効率(V_{max}/K_m)を求めた。第5表に示すように、219位、290位、239位の各アミノ酸を変異させることにより、GGA1ルシフェラーゼに対し触媒能力が向上することが確認された。

第5表

	V _{max} /K _m (x10 ⁹ RLU/mg)
GGA1ルシフェラーゼ	1.22
GGA1 T219Iルシフェラーゼ	2.16
GGA1 V290Iルシフェラーゼ	1.70
GGA1 V239Iルシフェラーゼ	1.58

〔実施例5〕

pH安定性の向上した変異型ルシフェラーゼを得るため、野生型ルシフェラーゼ遺伝子に任意の変異を導入した。

変異の導入にはヘイケボタル由来ルシフェラーゼの発現用プラスミドpHLf7 (特開平2-171189号公報記載)を鋳型、配列番号11 (AGAGATCCAA TTTATGGAAA C) 及び配列番号12 (AGCGTGAGAA AATCTGATCA C)で示されるオリゴヌクレオチドをプライマーとして用い、高頻度で変異が入ると報告されている0.5mMのMn²⁺存在下 (A JOURNAL OF METHODS IN CELL AND MOLECULAR BIOLOGY, Vol 1, No.1 (1989) p11-15)で常法に従いPCR反応を行なった。反応終了後、反応液に2倍容の冷エタノールを加え、エタノール沈澱を行なった。得られたDNAを再びTE緩衝液に溶解し、T4ポリヌクレオチドキナーゼバッファー中、10単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼ (宝酒造社製)を加え、37℃、30分間反応を行なった。次いで、この反応液を、0.8%の低融点アガロースゲル電気泳動に供した後、約5kbpのDNA断片を含むゲルを切り出し、65℃で5分間加熱することによりゲルを融解した。融解したゲルに2倍容のTE緩衝液[10mMトリス-塩酸 (pH8.0), 0.5mM EDTA]を加え、TE緩衝液で飽和したフェノールを等量添加し、攪拌した。遠心分離(12,000回転、15分間)後、水層を分取し2倍容の冷エタノールを加え、エタノール沈澱を行なった。このようにして約5kbpのDNA断片を回収した。回収した約5kbpのDNA断片50ngを、20μlのDNAリガーゼ緩衝液中で、10単位のT4 DNAリガーゼ (東洋紡績社製)を添

加し、15℃で16時間インキュベートした。反応混液を用いて大腸菌JM109をハナハン(Hana-han)の方法[DNA Cloning, 第1巻、第109 -135頁(1985)]により形質転換し、LB+Ampプレート〔バクトトリプトン1.0 % (W/V)、酵母エキス0.5% (W/V)、NaCl0.5% (W/V)、バクトアガー1.4% (W/V)、アンピシリン 50 μ l/ml〕上で、アンピシリン耐性のコロニーを選択した。

出現したコロニーをLB培地で培養したのち、実施例1に記載の方法により粗酵素を調製した。粗酵素を100mM 酢酸バッファー(pH5.5)中、25℃、22時間処理し、活性が低下しない株のスクリーニングを行なった。その結果、野生型では約70%以下に活性が低下してしまうのに対し、活性の低下がほとんど見られない株が得られた。この株よりアルカリSDS法によってプラスミドを取り出し、ダイブライマータックシークエンシングキット(アプライドバイオシステムズ社製)により反応を行ない、ABI 373A DNAシークエンサー(アプライドバイオシステムズ社製)で泳動解析を行なうことで塩基配列を確認した(配列番号13)。また、この塩基配列より予想されるアミノ酸配列を配列番号14に示した。以上のようにして得られたプラスミドをpHLKIと命名した。

プラスミドpHLKIを用いて大腸菌 JM109株を上記方法により形質転換した。このとき得られた大腸菌 JM109 (pHLKI)は工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-6347として寄託されている。

これをLB培地で培養したのち、実施例1に記載の方法により粗酵素液を調製し、特開平1-141592号公報記載の方法で酵素を純化した。この精製標品(HLKIルシフェラーゼ)について種々のバッファー中で25℃、22時間処理したのちの残存活性を測定した(第1図)。得られたHLKIルシフェラーゼは、第1図よりpH5.0から10.0の広い範囲で野生株以上の残存活性を示すことが判った。具体的な例として、第6表にpH5.0から6.0及びpH9.0から10.0の範囲の残存活性を示した。

第6表より、酸性側の100mM 酢酸バッファー(pH5.0)において、HLKIルシフェラーゼは、ヘイケ野生型に対し2.5倍以上の残存活性を示し、また、100mM Mesバッファー(pH5.5)において、6倍以上の残存活性を示した。一方、アルカリ側の100mM CHESバッファー(pH9.0)において、HLKIルシフェラーゼは、ヘイケ野生型に対し2.5倍以上の残存活性を示し、また、100mM CHESバッファー(pH9.5)において

、13倍以上の残存活性を示すことが明らかとなった。このことは特定のpHの緩衝液中における残存活性を、HLKIルシフェラーゼとヘイケ野生型とで比較したとき、HLKIルシフェラーゼにおいて残存活性が上昇していることを示す。

次に、80%以上の残存活性を示すpH範囲を比較すると、ヘイケ野生型ではpH6.5(100mM Mesバッファー) からpH8.5 (100mM TAPSバッファー) であるのに対し、HLKIルシフェラーゼではpH6.0 ～pH6.5 (100mM Mesバッファー) からpH9.0 (100mM TAPSバッファー) であることが判る。このことはHLKIルシフェラーゼをヘイケ野生型と比較したとき、80%以上の残存活性を示すpH範囲が広がっていることを示す。

以上の結果より、HLKIルシフェラーゼは、野生株以上のpH安定性をもち、この性質により野生型では行なうことのできなかったpH範囲での反応も可能となることから、極めて有用である。

第 6 表

	酸性側		アルカリ性側	
	酢酸バッファー	Mes バッファー	CHESバッファー	CAPSバッファー
p H	5.0 5.5	5.5 6.0	9.0 9.5	10.0
ヘイケ野生型	18.0 66.0	3.90 12.0	13.3 2.10	0.800
HLKIルシフェラーゼ	46.0 102	26.3 61.0	33.9 28.8	13.7

発明の効果

本発明によれば、耐熱性等の安定性に優れ、しかも触媒能力の高いルシフェラーゼを提供することができる。

配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

CTCTAGCATG CGAAAATCTA G

配列番号 : 2

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

CTGCAGGCCT GCAAGCTTGG

配列番号 : 3

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

ATCCTTTGTA TTTGATTAAA G

配列番号： 4

配列の長さ： 20

配列の型： 核酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の核酸 合成DNA

配列：

TCTAGAGTCG ACCTGCAGGC

配列番号： 5

配列の長さ： 552

配列の型： アミノ酸

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： ペプチド

配列の起源： ルシオラ・クルシアタ及びフォティナス・ピラリス

配列：

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Val Gly Pro Lys

1 5 10 15

Pro Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Thr Gln Leu Arg

20 25 30

Lys Tyr Met Glu Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr

35 40 45

Asn Ala Val Thr Gly Val Asp Tyr Ser Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu

50 55 60

Lys Ser Cys Cys Leu Gly Lys Ala Leu Gln Asn Tyr Gly Leu Val

65 70 75

Val Asp Gly Arg Ile Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe

80 85 90

Phe Ile Pro Val Ile Ala Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala

95	100	105
Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu		
110	115	120
Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu		
125	130	135
Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr Val Thr Thr Ile Lys Thr		
140	145	150
Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr Arg Gly Tyr Gln Cys		
155	160	165
Leu Asp Thr Phe Ile Lys Arg Asn Thr Pro Pro Gly Phe Gln Ala		
170	175	180
Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asp Arg Lys Glu Gln Val Ala		
185	190	195
Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val		
200	205	210
Gln Leu Thr His Glu Asn Thr Val Thr Arg Phe Ser His Ala Arg		
215	220	225
Asp Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu		
230	235	240
Ser Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu		
245	250	255
Gly Tyr Leu Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe		
260	265	270
Glu Glu Glu Leu Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln		
275	280	285
Ser Ala Leu Leu Val Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser		
290	295	300
Thr Leu Ile Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala		
305	310	315

Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala	320	325	330
Lys Arg Phe His Leu Pro Gly Ile Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr	335	340	345
Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys	350	355	360
Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro Phe Phe Glu Ala Lys Val	365	370	375
Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly Val Asn Gln Arg Gly	380	385	390
Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser Gly Tyr Val Asn	395	400	405
Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp Gly Trp Leu	410	415	420
His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His Phe Phe	425	430	435
Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln	440	445	450
Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn	455	460	465
Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly	470	475	480
Glu Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met	485	490	495
Thr Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr	500	505	510
Ala Lys Lys Leu Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro	515	520	525
Lys Gly Leu Thr Gly Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile			

530 535 540
 Leu Ile Lys Ala Lys Lys Gly Gly Lys Ser Lys Leu
 545 550 552

配列番号 : 6

配列の長さ : 1656

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源 : ルシオラ・クルシアタ及びフォティナス・ピラリス

配列 :

ATG GAA AAC ATG GAA AAC GAT GAA AAT ATT GTA GTT GGA CCT AAA CCG 48
 TTT TAC CCT ATC GAA GAG GGA TCT GCT GGA ACA CAA TTA CGC AAA TAC 96
 ATG GAG CGA TAT GCA AAA CTT GGC GCA ATT GCT TTT ACA AAT GCA GTT 144
 ACT GGT GTT GAT TAT TCT TAC GCC GAA TAC TTG GAG AAA TCA TGT TGT 192
 CTA GGA AAA GCT TTG CAA AAT TAT GGT TTG GTT GTT GAT GGC AGA ATT 240
 GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTT TTT ATT CCT GTA ATA GCC 288
 GGA CTG TTT ATA GGT GTA GGT GTT GCA CCC ACT AAT GAG ATT TAC ACT 336
 TTA CGT GAA CTG GTT CAC AGT TTA GGT ATC TCT AAA CCA ACA ATT GTA 384
 TTT AGT TCT AAA AAA GGC TTA GAT AAA GTT ATA ACA GTA CAG AAA ACA 432
 GTA ACT ACT ATT AAA ACC ATT GTT ATA CTA GAT AGC AAA GTT GAT TAT 480
 CGA GGA TAT CAA TGT CTG GAC ACC TTT ATA AAA AGA AAC ACT CCA CCA 528
 GGT TTT CAA GCA TCC AGT TTC AAA ACT GTG GAA GTT GAC CGT AAA GAA 576
 CAA GTT GCT CTT ATA ATG AAC TCT TCG GGT TCT ACC GGT TTG CCA AAA 624
 GGC GTA CAA CTT ACT CAC GAA AAT ACA GTC ACT AGA TTT TCG CAT GCC 672
 AGA GAT CCT ATT TTT GGC AAT CAA ATC ATT CCG GAT ACT GCG ATT TTA 720
 AGT GTT GTT CCA TTC CAT CAC GGT TTT GGA ATG TTT ACT ACA CTC GGA 768
 TAT TTG ATA TGT GGA TTT CGA GTC GTC TTA ATG TAT AGA TTT GAA GAA 816

GAG CTG TTT TTA CGA TCC CTT CAG GAT TAC AAA ATT CAA AGT GCG TTG 864
 CTA GTA CCA ACC CTA TTT TCA TTC TTC GCC AAA AGC ACT CTG ATT GAC 912
 AAA TAC GAT TTA TCT AAT TTA CAC GAA ATT GCT TCT GGG GGC GCA CCT 960
 CTT TCG AAA GAA GTC GGG GAA GCG GTT GCA AAA CGC TTC CAT CTT CCA 1008
 GGG ATA CGA CAA GGA TAT GGG CTC ACT GAG ACT ACA TCA GCT ATT CTG 1056
 ATT ACA CCC GAG GGG GAT GAT AAA CCG GGC GCG GTC GGT AAA GTT GTT 1104
 CCA TTT TTT GAA GCG AAG GTT GTG GAT CTG GAT ACC GGG AAA ACG CTG 1152
 GGC GTT AAT CAG AGA GGC GAA TTA TGT GTC AGA GGA CCT ATG ATT ATG 1200
 TCC GGT TAT GTA AAC AAT CCG GAA GCG ACC AAC GCC TTG ATT GAC AAG 1248
 GAT GGA TGG CTA CAT TCT GGA GAC ATA GCT TAC TGG GAC GAA GAC GAA 1296
 CAC TTC TTC ATA GTT GAC CGC TTG AAG TCT TTA ATT AAA TAC AAA GGA 1344
 TAT CAG GTG GCC CCC GCT GAA TTG GAA TCG ATA TTG TTA CAA CAC CCC 1392
 AAC ATC TTC GAC GCG GGC GTG GCA GGT CTT CCC GAC GAT GAC GCC GGT 1440
 GAA CTT CCC GCC GCC GTT GTT GTT TTG GAG CAC GGA AAG ACG ATG ACG 1488
 GAA AAA GAG ATC GTG GAT TAC GTC GCC AGT CAA GTA ACA ACC GCG AAA 1536
 AAG TTG CGC GGA GGA GTT GTG TTT GTG GAC GAA GTA CCG AAA GGT CTT 1584
 ACC GGA AAA CTC GAC GCA AGA AAA ATC AGA GAG ATC CTC ATA AAG GCC 1632
 AAG AAG GGC GGA AAG TCC AAA TTG 1656

配列番号 : 7

配列の長さ : 552

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の起源 : ルシオラ・クルシアタ及びフォティナス・ピラリス

配列 :

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile Val Val Gly Pro Lys

1

5

10

15

Pro Phe Tyr Pro Ile Glu Glu Gly Ser Ala Gly Thr Gln Leu Arg

20	25	30
Lys Tyr Met Glu Arg Tyr Ala Lys Leu Gly Ala Ile Ala Phe Thr		
35	40	45
Asn Ala Val Thr Gly Val Asp Tyr Ser Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu		
50	55	60
Lys Ser Cys Cys Leu Gly Lys Ala Leu Gln Asn Tyr Gly Leu Val		
65	70	75
Val Asp Gly Arg Ile Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe		
80	85	90
Phe Ile Pro Val Ile Ala Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala		
95	100	105
Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu		
110	115	120
Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu		
125	130	135
Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr Val Thr Thr Ile Lys Thr		
140	145	150
Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr Arg Gly Tyr Gln Cys		
155	160	165
Leu Asp Thr Phe Ile Lys Arg Asn Thr Pro Pro Gly Phe Gln Ala		
170	175	180
Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asp Arg Lys Glu Gln Val Ala		
185	190	195
Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val		
200	205	210
Gln Leu Thr His Glu Asn Ile Val Thr Arg Phe Ser His Ala Arg		
215	220	225
Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Val Leu		
230	235	240

Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu		
245	250	255
Gly Tyr Leu Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Met Leu Thr Lys Phe		
260	265	270
Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Thr		
275	280	285
Ser Val Ile Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Lys Ser		
290	295	300
Glu Leu Leu Asn Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala		
305	310	315
Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala		
320	325	330
Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr		
335	340	345
Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys		
350	355	360
Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val		
365	370	375
Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Ser Leu Gly Pro Asn Arg Arg Gly		
380	385	390
Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met Lys Gly Tyr Val Asn		
395	400	405
Asn Pro Glu Ala Thr Lys Glu Leu Ile Asp Glu Glu Gly Trp Leu		
410	415	420
His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys His Phe Phe		
425	430	435
Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln		
440	445	450
Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn		

455	460	465
Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly		
470	475	480
Glu Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met		
485	490	495
Thr Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr		
500	505	510
Ala Lys Lys Leu Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro		
515	520	525
Lys Gly Leu Thr Gly Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile		
530	535	540
Leu Ile Lys Ala Lys Lys Gly Gly Lys Ser Lys Leu		
545	550	552

配列番号 : 8

配列の長さ : 1656

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源 : ルシオラ・クルシアタ及びフォティナス・ピラリス

配列 :

ATG GAA AAC ATG GAA AAC GAT GAA AAT ATT GTA GTT GGA CCT AAA CCG	48
TTT TAC CCT ATC GAA GAG GGA TCT GCT GGA ACA CAA TTA CGC AAA TAC	96
ATG GAG CGA TAT GCA AAA CTT GGC GCA ATT GCT TTT ACA AAT GCA GTT	144
ACT GGT GTT GAT TAT TCT TAC GCC GAA TAC TTG GAG AAA TCA TGT TGT	192
CTA GGA AAA GCT TTG CAA AAT TAT GGT TTG GTT GTT GAT GGC AGA ATT	240
GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTT TTT ATT CCT CTA ATA GCC	288
GGA CTG TTT ATA GGT GTA GGT GTT GCA CCC ACT AAT GAG ATT TAC ACT	336

TTA CGT GAA CTG GTT CAC AGT TTA GGT ATC TCT AAA CCA ACA ATT GTA 384
TTT AGT TCT AAA AAA GGC TTA GAT AAA GTT ATA ACA GTA CAG AAA ACA 432
GTA ACT ACT ATT AAA ACC ATT GTT ATA CTA GAT AGC AAA GTT GAT TAT 480
CGA GGA TAT CAA TGT CTG GAC ACC TTT ATA AAA AGA AAC ACT CCA CCA 528
GGT TTT CAA GCA TCC AGT TTC AAA ACT GTG GAA GTT GAC CGT AAA GAA 576
CAA GTT GCT CTT ATA ATG AAC TCT TCG GGT TCT ACC GGT TTG CCA AAA 624
GGC GTA CAA CTT ACT CAC GAA AAT ATA GTC ACT AGA TTT TCT CAT GCT 672
AGA GAT CCG ATT TAT GGT AAC CAA GTT TCA CCA GGC ACC GCT GTT TTA 720
ACT GTC GTT CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT ATG TTC ACT ACT CTA GGG 768
TAT TTA ATT TGT GGT TTT CGT GTT GTA ATG TTA ACA AAA TTC GAT GAA 816
GAA ACA TTT TTA AAA ACT CTA CAA GAT TAT AAA TGT ACA AGT GTT ATT 864
CTT GTA CCG ACC TTG TTT GCA ATT CTC AAC AAA AGT GAA TTA CTC AAT 912
AAA TAC GAT TTG TCA AAT TTA GTT GAG ATT GCA TCT GGC GGA GCA CCT 960
TTA TCA AAA GAA GTT GGT GAA GCT GTT GCT AGA CGC TTT AAT CTT CCC 1008
GGT GTT CGT CAA GGT TAT GGT TTA ACA GAA ACA ACA TCT GCC ATT ATT 1056
ATT ACA CCG GAA GGT GAC GAT AAA CCA GGA GCT TCT GGA AAA GTC GTG 1104
CCG TTG TTT AAA GCA AAA GTT ATT GAT CTT GAT ACT AAA AAA TCT TTA 1152
GGT CCT AAC AGA CGT GGA GAA GTT TGT GTT AAA GGA CCT ATG CTT ATG 1200
AAA GGT TAT GTA AAT AAT CCA GAA GCA ACA AAA GAA CTT ATT GAC GAA 1248
GAA GGT TGG CTG CAC ACC GGA GAT ATT GGA TAT TAT GAT GAA GAA AAA 1296
CAT TTC TTT ATT GTC GAT CGT TTG AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA 1344
TAT CAG GTG GCC CCC GCT GAA TTG GAA TCG ATA TTG TTA CAA CAC CCC 1392
AAC ATC TTC GAC GCG GCG GTG GCA GGT CTT CCC GAC GAT GAC GCC GGT 1440
GAA CTT CCC GCC GCC GTT GTT GTT TTG GAG CAC GGA AAG ACG ATG ACG 1488
GAA AAA GAG ATC GTG GAT TAC GTC GCC AGT CAA GTA ACA ACC GCG AAA 1536
AAG TTG CGC GGA GGA GTT GTG TTT GTG GAC GAA GTA CCG AAA GGT CTT 1584
ACC GGA AAA CTC GAC GCA AGA AAA ATC AGA GAG ATC CTC ATA AAG GCC 1632
AAG AAG GGC GGA AAG TCC AAA TTG 1656

配列番号：9

配列の長さ：1656

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源：ルシオラ・ラテラリス、フォティナス・ピラリス

配列：

ATG GAA AAC ATG GAG AAC GAT GAA AAT ATT GTG TAT GGT CCT GAA CCA 48
TTT TAC CCT ATT GAA GAG GGA TCT GCT GGA GCA CAA TTG CGC AAG TAT 96
ATG GAT CGA TAT GCA AAA CTT GGA GCA ATT GCT TTT ACT AAC GCA CTT 144
ACC GGT GTC GAT TAT ACG TAC GCC GAA TAC TTA GAA AAA TCA TGC TGT 192
CTA GGA GAG GCT TTA AAG AAT TAT GGT TTG GTT GTT GAT GGA AGA ATT 240
GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTC TTT ATT CCT GTA TTA GCC 288
GGT TTA TTT ATA GGT GTC GGT GTG GCT CCA ACT AAT GAG ATT TAC ACT 336
CTA CGT GAA TTG GTT CAC AGT TTA GGC ATC TCT AAG CCA ACA ATT GTA 384
TTT AGT TCT AAA AAA GGA TTA GAT AAA GTT ATA ACT GTA CAA AAA ACG 432
GTA ACT GCT ATT AAA ACC ATT GTT ATA TTG GAC AGC AAA GTG GAT TAT 480
AGA GGT TAT CAA TCC ATG GAC AAC TTT ATT AAA AAA AAC ACT CCA CAA 528
GGT TTC AAA GGA TCA AGT TTT AAA ACT GTA GAA GTT AAC CGC AAA GAA 576
CAA GTT GCT CTT ATA ATG AAC TCT TCG GGT TCA ACC GGT TTG CCA AAA 624
GGT GTG CAA CTT ACT CAT GAA AAT TTG GTC ACT AGA TTT TCT CAC GCT 672
AGA GAT CCA ATT TAT GGA AAC CAA GTT TCA CCA GGC ACG GCT ATT TTA 720
ACT GTA GTA CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT ATG TTT ACT ACT TTA GGC 768
TAT CTA ACT TGT GGT TTT CGT ATT GTC ATG TTA ACG AAA TTT GAC GAA 816
GAG ACT TTT TTA AAA ACA CTG CAA GAT TAC AAA TGT TCA AGC GTT ATT 864
CTT GTA CCG ACT TTG TTT GCA ATT CTT AAT AGA AGT GAA TTA CTC GAT 912
AAA TAT GAT TTA TCA AAT TTA GTT GAA ATT GCA TCT GGC GGA GCA CCT 960
TTA TCT AAA GAA ATT GGT GAA GCT GTT GCT AGA CGT TTT AAT TTA CCG 1008

GGT GTT CGT CAA GGC TAT GGT TTA ACA GAA ACA ACC TCT GCA ATT ATT 1056
 ATC ACA CCG GAA GGC GAT GAT AAA CCA GGT GCT TCT GGC AAA GTT GTG 1104
 CCA TTA TTT AAA GCA AAA GTT ATC GAT CTT GAT ACT AAA AAA ACT TTG 1152
 GGC CCG AAC AGA CGT GGA GAA GTT TGT GTA AAG GGT CCT ATG CTT ATG 1200
 AAA GGT TAT GTA GAT AAT CCA GAA GCA ACA AGA GAA ATC ATA GAT GAA 1248
 GAA GGT TGG TTG CAC ACA GGA GAT ATT GGG TAT TAC GAT GAA GAA AAA 1296
 CAT TTC TTT ATC GTG GAT CGT TTG AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA 1344
 TAT CAG GTG GCC CCC GCT GAA TTG GAA TCG ATA TTG TTA CAA CAC CCC 1392
 AAC ATC TTC GAC GCG GGC GTG GCA GGT CTT CCC GAC GAT GAC GCC GGT 1440
 GAA CTT CCC GCC GCC GTT GTT GTT TTG GAG CAC GGA AAG ACG ATG ACG 1488
 GAA AAA GAG ATC GTG GAT TAC GTC GCC AGT CAA GTA ACA ACC GCG AAA 1536
 AAG TTG CGC GGA GGA GTT GTG TTT GTG GAC GAA GTA CCG AAA GGT CTT 1584
 ACC GGA AAA CTC GAC GCA AGA AAA ATC AGA GAG ATC CTC ATA AAG GCC 1632
 AAG AAG GGC GGA AAG TCC AAA TTG 1656

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 552

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の起源 : ルシオラ・ラテラリス、フォティナス・ピラリス

配列 :

Met	Glu	Asn	Met	Glu	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Val	Tyr	Gly	Pro	Glu
1			5						10					15
Pro	Phe	Tyr	Pro	Ile	Glu	Glu	Gly	Ser	Ala	Gly	Ala	Gln	Leu	Arg
			20						25					30
Lys	Tyr	Met	Asp	Arg	Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Ala	Phe	Thr
			35						40					45
Asn	Ala	Leu	Thr	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Leu	Glu

50	55	60
Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Val		
65	70	75
Val Asp Gly Arg Ile Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe		
80	85	90
Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala		
95	100	105
Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu		
110	115	120
Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu		
125	130	135
Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr Val Thr Ala Ile Lys Thr		
140	145	150
Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr Arg Gly Tyr Gln Ser		
155	160	165
Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Lys Gly		
170	175	180
Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu Gln Val Ala		
185	190	195
Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val		
200	205	210
Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Thr Arg Phe Ser His Ala Arg		
215	220	225
Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu		
230	235	240
Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu		
245	250	255
Gly Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe		
260	265	270

Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser	275	280	285
Ser Val Ile Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser	290	295	300
Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala	305	310	315
Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala	320	325	330
Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr	335	340	345
Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys	350	355	360
Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val	365	370	375
Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asn Arg Arg Gly	380	385	390
Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met Lys Gly Tyr Val Asp	395	400	405
Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu Glu Gly Trp Leu	410	415	420
His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys His Phe Phe	425	430	435
Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln	440	445	450
Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn	455	460	465
Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly	470	475	480
Glu Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met			

485	490	495
Thr Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val	Ala Ser Gln Val Thr Thr	
500	505	510
Ala Lys Lys Leu Arg Gly Gly Val Val	Phe Val Asp Glu Val Pro	
515	520	525
Lys Gly Leu Thr Gly Lys Leu Asp Ala	Arg Lys Ile Arg Glu Ile	
530	535	540
Leu Ile Lys Ala Lys Lys Gly Gly Lys	Ser Lys Leu	
545	550	

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

AGAGATCCAA TTTATGGAAA C

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列 :

AGCGTGAGAA AATCTGATCA C

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 1644

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：配列の種類：cDNA to mRNA

起源：ルシオラ・ラテラリス

配列：

```
ATG GAA AAC ATG GAG AAC GAT GAA AAT ATT GTG TAT GGT CCT GAA CCA 48
TTT TAC CCT ATT GAA GAG GGA TCT GCT GGA GCA CAA TTG CGC AAG TAT 96
ATG GAT CGA TAT GCA AAA CTT GGA GCA ATT GCT TTT ACT AAC GCA CTT 144
ACC GGT GTC GAT TAT ACG TAC GCC GAA TAC TTA GAA AAA TCA TGC TGT 192
CTA GGA GAG GCT TTA AAG AAT TAT GGT TTG GTT GTT GAT GGA AGA ATT 240
GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTC TTT ATT CCT GTA TTA GCC 288
GGT TTA TTT ATA GGT GTC GGT GTG GCT CCA ACT AAT GAG ATT TAC ACT 336
CTA CGT GAA TTG GTT CAC AGT TTA GGC ATC TCT AAG CCA ACA ATT GTA 384
TTT AGT TCT AAA AAA GGA TTA GAT AAA GTT ATA ACT GTA CAA AAA ACG 432
GTA ACT GCT ATT AAA ACC ATT GTT ATA TTG GAC AGC AAA GTG GAT TAT 480
AGA GGT TAT CAA TCC ATG GAC AAC TTT ATT AAA AAA AAC ACT CCA CAA 528
GGT TTC AAA GGA TCA AGT TTT AAA ACT GTA GAA GTT AAC CGC AAA GAA 576
CAA GTT GCT CTT ATA ATG AAC TCT TCG GGT TCA ACC GGT TTG CCA AAA 624
GGT GTG CAA CTT ACT CAT GAA AAT TTG GTG ATC AGA TTT TCT CAC GCT 672
AGA GAT CCA ATT TAT GGA AAC CAA GTT TCA CCA GGC ACG GCT ATT TTA 720
ACT GTA GTA CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT ATG TTT ACT ACT TTA GGC 768
TAT CTA ACT TGT GGT TTT CGT ATT GTC ATG TTA ACG AAA TTT GAC GAA 816
GAG ACT TTT TTA AAA ACA CTG CAA GAT TAC AAA TGT TCA AGC GTT ATT 864
CTT GTA CCG ACT TTG TTT GCA ATT CTT AAT AGA AGT GAA TTA CTC GAT 912
AAA TAT GAT TTA TCA AAT TTA GTT GAA ATT GCA TCT GGC GGA GCA CCT 960
TTA TCT AAA GAA ATT GGT GAA GCT GTT GCT AGA CGT TTT AAT TTA CCG 1008
GGT GTT CGT CAA GGC TAT GGT TTA ACA GAA ACA ACC TCT GCA ATT ATT 1056
ATC ACA CCG GAA GGC GAT GAT AAA CCA GGT GCT TCT GGC AAA GTT GTG 1104
```

CCA TTA TTT AAA GCA AAA GTT ATC GAT CTT GAT ACT AAA AAA ACT TTG 1152
 GGC CCG AAC AGA CGT GGA GAA GTT TGT GTA AAG GGT CCT ATG CTT ATG 1200
 AAA GGT TAT GTA GAT AAT CCA GAA GCA ACA AGA GAA ATC ATA GAT GAA 1248
 GAA GGT TGG TTG CAC ACA GGA GAT ATT GGG TAT TAC GAT GAA GAA AAA 1296
 CAT TTC TTT ATC GTG GAT CGT TTG AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA 1344
 TAT CAA GTA CCA CCT GCT GAA TTA GAA TCT GTT CTT TTG CAA CAT CCA 1392
 AAT ATT TTT GAT GCC GGC GTT GCT GGC GTT CCA GAT CCT ATA GCT GGT 1440
 GAG CTT CCG GGA GCT GTT GTT GTA CTT AAG AAA GGA AAA TCT ATG ACT 1488
 GAA AAA GAA GTA ATG GAT TAC GTT GCT AGT CAA GTT TCA AAT GCA AAA 1536
 CGT TTG CGT GGT GGT GTC CGT TTT GTC GAC GAA GTA CCT AAA GGT CTC 1584
 ACT GGT AAA ATT GAC GGT AAA GCA ATT AGA GAA ATA CTG AAG AAA CCA 1632
 GTT GCT AAG ATG 1644

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 548

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の起源 : ルシオラ・ラテラリス

配列 :

Met	Glu	Asn	Met	Glu	Asn	Asp	Glu	Asn	Ile	Val	Tyr	Gly	Pro	Glu
1			5					10					15	
Pro	Phe	Tyr	Pro	Ile	Glu	Glu	Gly	Ser	Ala	Gly	Ala	Gln	Leu	Arg
			20					25					30	
Lys	Tyr	Met	Asp	Arg	Tyr	Ala	Lys	Leu	Gly	Ala	Ile	Ala	Phe	Thr
			35					40					45	
Asn	Ala	Leu	Thr	Gly	Val	Asp	Tyr	Thr	Tyr	Ala	Glu	Tyr	Leu	Glu
			50					55					60	
Lys	Ser	Cys	Cys	Leu	Gly	Glu	Ala	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Leu	Val

65	70	75
Val Asp Gly Arg Ile Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe		
80	85	90
Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile Gly Val Gly Val Ala		
95	100	105
Pro Thr Asn Glu Ile Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu		
110	115	120
Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser Ser Lys Lys Gly Leu		
125	130	135
Asp Lys Val Ile Thr Val Gln Lys Thr Val Thr Ala Ile Lys Thr		
140	145	150
Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr Arg Gly Tyr Gln Ser		
155	160	165
Met Asp Asn Phe Ile Lys Lys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Lys Gly		
170	175	180
Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg Lys Glu Gln Val Ala		
185	190	195
Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val		
200	205	210
Gln Leu Thr His Glu Asn Leu Val Ile Arg Phe Ser His Ala Arg		
215	220	225
Asp Pro Ile Tyr Gly Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu		
230	235	240
Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu		
245	250	255
Gly Tyr Leu Thr Cys Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe		
260	265	270
Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln Asp Tyr Lys Cys Ser		
275	280	285

Ser Val Ile Leu Val Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser	290	295	300
Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu Val Glu Ile Ala	305	310	315
Ser Gly Gly Ala Pro Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala	320	325	330
Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr	335	340	345
Glu Thr Thr Ser Ala Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys	350	355	360
Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu Phe Lys Ala Lys Val	365	370	375
Ile Asp Leu Asp Thr Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asn Arg Arg Gly	380	385	390
Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met Lys Gly Tyr Val Asp	395	400	405
Asn Pro Glu Ala Thr Arg Glu Ile Ile Asp Glu Glu Gly Trp Leu	410	415	420
His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu Glu Lys His Phe Phe	425	430	435
Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln	440	445	450
Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu Leu Gln His Pro Asn	455	460	465
Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly	470	475	480
Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Lys Lys Gly Lys Ser Met	485	490	495
Thr Glu Lys Glu Val Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn			

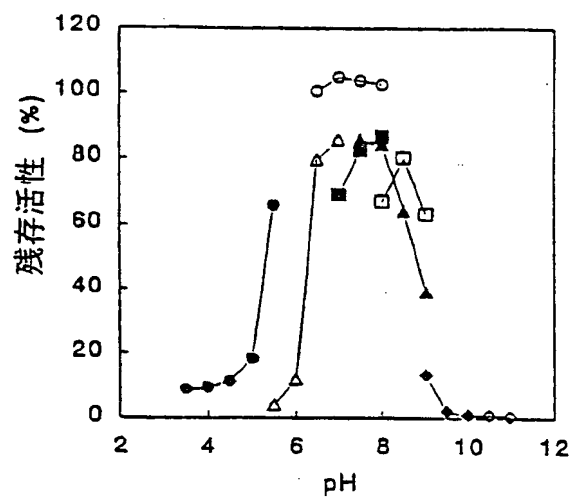
500	505	510
Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe Val Asp Glu Val Pro		
515	520	525
Lys Gly Leu Thr Gly Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile		
530	535	540
Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met		
545		

請 求 の 範 囲

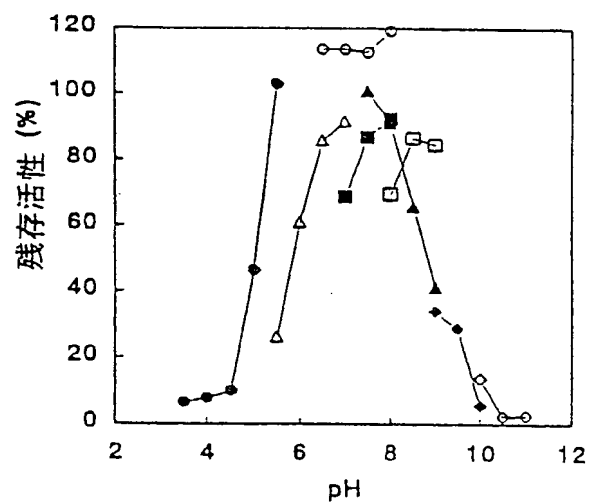
1. 触媒能力もしくは安定性の向上した生物発光タンパク質。
2. 触媒能力の向上としては、基質親和性、最大反応速度、安定性の向上としては耐熱性、pH安定性、低イオン濃度下での安定性の5種のうち、いずれか1種以上を含むことを特徴とする請求項1に記載の生物発光タンパク質。
3. 生物発光タンパク質が、甲虫類 (Coleoptera) 由来ルシフェラーゼであることを特徴とする請求項1または請求項2に記載の生物発光タンパク質。
4. 生物発光タンパク質が、ホタル由来ルシフェラーゼであることを特徴とする請求項1または請求項2に記載の生物発光タンパク質。
5. 生物発光タンパク質の前駆体の修飾により産生することを特徴とする、請求項1または請求項2に記載の生物発光タンパク質の製造法。
6. 前記修飾として、1個以上のアミノ酸の置換、改変、除去、添加、及び複数のタンパク質の融合を特徴とする、請求項1または請求項2に記載の生物発光タンパク質の製造法。
7. ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつ複数種のホタルルシフェラーゼを融合してなる請求項1または請求項2に記載の生物発光タンパク質。
8. ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつゲンジボタル及びアメリカボタルルシフェラーゼを融合してなる請求項1または請求項2に記載の生物発光タンパク質。
9. ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつヘイケボタル及びアメリカボタルルシフェラーゼを融合してなる請求項1または請求項2に記載の生物発光タンパク質。
10. ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつゲンジボタル及びヘイケボタルルシフェラーゼを融合してなる請求項1または請求項2に記載の生物発光タンパク質。
11. ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつゲンジホタルルシフェラーゼの219番目に対応するアミノ酸残基が変異されていることを特徴とする請求項1または請求項2に記載の生物発光タンパク質。

12. ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつゲンジホタルルシフェラーゼの 2 3 9 番目に対応するアミノ酸残基が変異されていることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の生物発光タンパク質。
13. ホタルルシフェラーゼ活性を有し、かつゲンジホタルルシフェラーゼの 2 9 0 番目に対応するアミノ酸残基が変異されていることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の生物発光タンパク質。

第1図

ハイケ野生型

- 100mM 酢酸
- 100mM リン酸
- ▲ 100mM Tris-HCl
- △ 100mM Mes
- 100mM HEPES
- 100mM TAPS
- ◆ 100mM CHES
- ◇ 100mM CAPS

HLKIルシフェラーゼ

- 100mM 酢酸
- 100mM リン酸
- ▲ 100mM Tris-HCl
- △ 100mM Mes
- 100mM HEPES
- 100mM TAPS
- ◆ 100mM CHES
- ◇ 100mM CAPS

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブタベスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) キッコーマン株式会社
取締役社長 茂木 友三郎 殿
寄託者
あて名 〒 278
千葉県野田市野田 339 番地

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) 大腸菌 (E. coli) JM109 (pGA1)	(受託番号) FERM BP- 5990
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 6 月 20 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブタベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>National Institute of Bioscience and Human-Technology 名称: Agency of Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大石 道夫 Michio Oishi, Ph.D., DIRECTOR GENERAL.</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1-chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN</p> <p>平成 9 年 (1997) 6 月 20 日</p>	

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) キッコーマン株式会社
取締役社長 茂木 友三郎
寄託者 あて名 〒 278 殿
千葉県野田市野田339番地

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) 大腸菌 (E. coli) JM109 (pHHA1)	(受託番号) FERM BP- 6203
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 12 月 11 日 (原寄託日) に受領した1欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に1欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Agency for Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大箸 信 Dr. Shinobu Oshiki Director-General</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN</p>	
平成 9 年 (1997) 12 月 11 日	

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) キッコーマン株式会社
取締役社長 茂木 友三郎
寄託者 殿
あて名 〒 278
千葉県野田市野田 339 番地

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) 大腸菌 (E. coli) JM109 (pGGA2-4)	(受託番号) FERM BP- 6204
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 12 月 11 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 名称: Agency of Industrial Science and Technology 所長 大箸 信 Dr. Shinobu Oshigahara, Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 9 年 (1997) 12 月 11 日	

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブタベスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

キッコーマン株式会社

取締役社長 茂木 友三郎

寄託者

あて名

〒

278

千葉県野田市野田339番地

殿

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) 大腸菌 (E. coli) JM109 (pGGA1-4)	(受託番号) FERM BP- 6205
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 12 月 11 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブダベスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology 所長 大箸 信 Dr. Shinji Ohsaka Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 9 年 (1997) 12 月 11 日	

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) キッコーマン株式会社
取締役社長 茂木 友三郎 殿
寄託者
あて名 〒 278
千葉県野田市野田339番地

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) 大腸菌 (E. coli) JM109 (pGGA2-1)	(受託番号) FERM BP- 6206
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 12 月 11 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Agency for Industrial Science and Technology</p> <p>所 長 大 箸 信 一 Dr. Shigeaki Ohtsuka, Director-General</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN</p>	
平成 9 年 (1997) 12 月 11 日	

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) キッコーマン株式会社
取締役社長 茂木 友三郎

寄託者

あ て 名

殿

千葉県野田市野田 3 3 9 番地

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) 大腸菌 JM109 (pHLKI)	(受託番号) FERM BP- 6347
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。	
<input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 10 年 5 月 12 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 名称: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology 所長 大箸 信 Dr. Shinobu Oshiki Director-General あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN 平成 10 年 (1998) 5 月 12 日	

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) キッコーマン株式会社
取締役社長 茂木 友三郎 殿
寄託者
あて名 〒 278
千葉県野田市野田339番地

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) 大腸菌 (E. coli) JM109 (pGGA1)	(受託番号) FERM BP- 5989
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input type="checkbox"/> 科学的性質 <input type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 6 月 20 日 (原寄託日) に受領した 1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、 年 月 日 (原寄託日) に 1 欄の微生物を受領した。 そして、 年 月 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
<p>通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所</p> <p>National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency for Industrial Science and Technology</p> <p>所長 大石 道夫 Michio Oishi, Ph.D., DIRECTOR GENERAL.</p> <p>あて名: 日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN</p> <p>平成 9 年 (1997) 6 月 20 日</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP98/02936

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N9/02, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/53, C12N9/02, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP, 03-285683, A (Kikkoman Corp.), 16 December, 1991 (16. 12. 91) & EP, 449621 & US, 5219737	1-6, 12
X	Biochimica et Biophysica Acta Vol. 1292 No. 1 (1996) Jonathan P. Waud et al., "Engineering the C-terminus of firefly luciferase as an indicator of covalent modification of proteins" p.89-98	16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ Sec patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
18 August, 1998 (18. 08. 98)

Date of mailing of the international search report
1 September, 1998 (01. 09. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/53, C12N9/02, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/53, C12N9/02, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 03-285683, A (キッコーマン株式会社) 16. 12月. 1991 (16. 12. 91) , & EP, 449621 & US 5219737	1-6, 12
X	Biochimica et Biophysica Acta Vol. 1292 No. 1 (1996) Jonathan P. Waud et al. 「Engineering the C-terminus of firefly luciferase as an indicator of covalent modification of proteins」 p. 89-98	1-6

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18. 08. 98

国際調査報告の発送日

01.09.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4 B

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

THIS PAGE BLANK (USPTO)